

UNIVERSITE MONTPELLIER II
Sciences et Techniques du Languedoc
place Eugène Bataillon
34000 Montpellier

AG-179484
SA-TH346
CIRAD FORET
Programme Arbres et Plantations
Laboratoire de génétique
Campus international de Baillarguet
Montferrier-sur-Lez BP 5035
34032 Montpellier

21 SEP. 1999
RAPPORT DE STAGE DE MAITRISE
DE PHYSIOLOGIE VEGETALE APPLIQUEE

ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE CHEZ
Santalum austrocaledonicum DE NOUVELLE-CALEDONIE
PAR LA TECHNIQUE RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC
DNA (RAPD)

Par

Isabelle PACAULT

Maître de stage : Daniel VERHAEGEN

15 juin 1999- 15 septembre 1999

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet



TH03135

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Daniel Verhaegen qui, en me proposant ce stage, m'a permis de faire mes premiers pas dans le monde de la recherche.

Je remercie Marie-Hélène Chevallier, responsable du laboratoire de génétique dans lequel j'ai exercé cet été.

Je remercie également Bernard Mallet, qui m'a accueillie au sein du programme Arbres et Plantations, et Jacques Valeix qui m'a acceptée dans le département du CIRAD Forêt.

J'adresse toute ma reconnaissance à Yves Ehrart, qui a partagé avec moi un peu de son savoir sur les santals à travers les corrections qu'il a apportées à mon rapport.

J'ai une pensée toute particulière pour Mireille Poitel, dont les conseils de laboratoire m'ont été plus qu'utiles... Sa pédagogie, sa gentillesse et sa patience ont été un encadrement de rêve (vive les codes couleurs !) !

Enfin, ce stage ne se serait certainement pas aussi bien passé sans toutes les personnes que j'ai rencontrées au sein du programme Arbres et Plantations et même ailleurs !! Je pense à Sandrine (courage pour ta thèse!), Khady, Diallo (A Diallo !), Alexandre, Elizabeth, Franck, Jean-Marc (quel blagueur...), Sophie, Michèle (merci pour votre bureau!!), Roselyne, Anne, Thomas...

UNIVERSITE MONTPELLIER II
Sciences et Techniques du Languedoc
place Eugène Bataillon
34000 Montpellier

CIRAD FORET
Programme Arbres et Plantations
Laboratoire de génétique
Campus international de Baillarguet
Montferrier-sur-Lez BP 5035
34032 Montpellier

RAPPORT DE STAGE DE MAITRISE
DE PHYSIOLOGIE VEGETALE APPLIQUEE

ETUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE CHEZ
Santalum austrocaledonicum DE NOUVELLE-CALEDONIE
PAR LA TECHNIQUE RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC
DNA (RAPD)

Par

Isabelle PACAULT

Maître de stage : Daniel VERHAEGEN

15 juin 1999- 15 septembre 1999

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS

PRESENTATION DU CIRAD FORET

INTRODUCTION.....	1
1. MATERIEL ET METHODES.....	4
1.1. MATERIEL VEGETAL.....	4
1.2. REVELATION DU POLYMORPHISME MOLECULAIRE.....	4
1.2.1. <u>Extraction et dosage de l'ADN</u>	5
1.2.2. <u>Amplification de l'ADN</u>	5
➤ <u>Conditions d'amplification</u>	5
➤ <u>Choix des amorces</u>	6
1.2.3. <u>Electrophorèse et révélation des marqueurs RAPD</u>	6
➤ <u>Migration et révélation des marqueurs RAPD</u>	6
➤ <u>Acquisition des données de marquage</u>	6
1.3. METHODES D'ESTIMATION DES DISTANCES GENETIQUES A PARTIR DES DONNEES RAPD.....	7
1.3.1. <u>Indices de similarité</u>	7
1.3.2. <u>Distances génétiques calculées à partir des indices de similarité</u>	8
2. RESULTATS.....	9
2.1. ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE A PARTIR DE LA MATRICE DE DONNEES TOTALE.....	9
2.1.1. <u>Emploi de plusieurs indices avec la méthode de calcul des Scores</u>	9
2.1.2. <u>Emploi de plusieurs méthodes de calcul avec l'indice de Dice</u>	10
2.2. ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE A PARTIR D'UNE MATRICE DE DONNEES PARTIELLE.....	12
3. DISCUSSION.....	13
3.1. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA TECHNIQUE RAPD.....	13
3.2. IMPACTS DES DIFFERENTS INDICES DE SIMILARITE ET METHODES DE CALCUL SUR LES DENDROGRAMMES.....	13
3.3. DIVERSITE GENETIQUE AU SEIN DE <i>S. austrocaledonicum</i>	14
3.4. PERSPECTIVES APORTEES PAR LES RESULTATS.....	15
3.4.1. <u>Nécessité d'élargir les données et l'échantillonnage</u>	15
3.4.2. <u>Relation entre les résultats et des analyses chimiques de composition des bois</u>	16
CONCLUSION.....	17
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	18
ANNEXES	

ABREVIATIONS

BET : Bromure d'Ethidium

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique acide

FAO : Food Agricultural Organisation

NTSYS-pc : Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System

PCR : Polymerisation Reaction Chain

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism

TBE : Tris Borate EDTA

TRIS : Tris hydroxymethyl amino méthane

UPGMA : Unweighted Pair Group Method Arithmetic average

LE CIRAD FORET,

département forestier du CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement), exerce des activités de recherche et développement sur :

- ➡ l'arbre
- ➡ les forêts
- ➡ leurs interactions avec les hommes
- ➡ et leurs produits

dans les pays tropicaux.

Trois repères principaux guident ses activités dans le domaine de la foresterie : le développement durable, l'optimisation des filières de production et de transformation, l'accroissement des connaissances scientifiques.

Le CIRAD Forêt est organisé en programmes techniques dont celui des **Arbres et des Plantations**. Son objectif est d'apporter un appui scientifique et technique à la mise en place et à la gestion durable de plantations forestières, villageoises et industrielles. Cette approche se fonde sur la physiologie, l'amélioration génétique, les sciences sociales, l'économie... et concerne plusieurs espèces stratégiques : eucalyptus, acacias, teck, rotins.



Santal de franc pied (*Santalum austrocaledonicum* var *austrocaledonicum*), à proximité du Pic Tiaoué (source : Y. Ehrart).

INTRODUCTION

Le genre *Santalum*, dont les arbres sont communément connus sous le nom de santals, regroupe seize espèces plus ou moins variables. Certaines sont séparées en variétés (*S.austrocaledonicum* Vieillard, par exemple, trois variétés en Nouvelle Calédonie) ; d'autres, telle *S.fernandezianum*, ont été traitées comme un unique taxon mais le traitement taxonomique du genre n'est pas encore définitif. On distingue les variétés de santals par des critères morphologiques : chez *S.austrocaledonicum*, la variété *minutum* possède des feuilles plus petites et plus rondes que celles de la variété *austrocaledonicum*. Cette caractéristique paraît varier non seulement avec l'âge, mais encore suivant les individus ou les populations (Hallé 1988). Ce genre est représenté par des arbres, des arbustes ou des arbrisseaux à bois jaune, parfois brun ou rouge. Les espèces, hermaphrodites, sont certainement allogames et leurs fruits sont des drupes globuleuses noirâtres à maturité.

Les santals sont présents dans la région pacifique tropicale, de l'Inde au large de l'Amérique du sud. Cette superficie est immense mais *Santalum* y est largement réparti, depuis un centre de dispersion que l'on situe entre 0-30° S et 120-170° E (Australie, Nouvelle-Guinée, Nouvelle-Calédonie et Vanuatu) jusqu'à des parties excessivement isolées du Pacifique (îles Juan Fernandez). Le contexte insulaire et les conditions écologiques divergentes d'une île à une autre font l'originalité de l'aire de répartition des santals et fournissent des pluviosités et des altitudes variées pour la croissance de ces arbres. Par exemple, *S. austrocaledonicum* vit jusqu'à 300 m d'altitude, où les précipitations sont comprises entre 900 et 1700 mm. Par contre, *S. insulare alticola*, du Pacifique sud, se plaît à des altitudes supérieures à 1100 m. Les sols sur lesquels se développent les santals sont également de natures variées : leur pH oscille entre des valeurs acides (5-6) et des valeurs nettement basiques (8-9) et leur texture se décline sur une large gamme allant des sables grossiers aux argiles limoneuses. Le seul point commun est le drainage, un santal ne pouvant pas se développer sur un sol mal drainé ou inondé.

Face à une telle diversité écologique, il semble difficile de trouver des similitudes entre santals. Cependant, une caractéristique est commune au genre entier : l'hémiparasitisme. Le plant doit être associé à un arbre-hôte pour assurer sa croissance, bien qu'il puisse subvenir en partie à ses besoins. C'est par les racines que le santal puise de l'hôte les substances nutritives nécessaires, en particulier l'azote. Ainsi, bien qu'il n'y ait pas de véritables hôtes spécifiques, un bon nombre

d'espèces de santal semblent affectionner les plantes-hôtes fixatrices d'azote : *Acacia*, *Casuarina* etc (Radomiljac et McComb 1997). La couleur du bois pourrait être liée, au moins dans le jeune âge, à la plante hôte et à ses particularités chimiques. Le tanin du Gaiac rouge (*Acacia spirorbis*) pourrait alors être responsable de la couleur du Santal rouge (Hallé 1988).

Le santal est mondialement reconnu pour son bois de coeur, riche en huile essentielle à effet antiseptique. Cette substance doit sa senteur à des sesquiterpènes, les α et β santalols, qui représentent 90% de l'huile et sont ses molécules les plus odorantes. Le santalyl acetate et les α et β santalènes, dérivés oxygénés (6 %) , contribuent aussi à son odeur caractéristique. Divers facteurs tels que l'âge du bois de coeur, la nature du sol, le climat et les prédispositions génétiques déterminent la teneur en huile qui demeure généralement faible (2.5 - 6.2 %). L'huile recueillie par hydrodistillation est utilisée en cosmétique, en parfumerie et en aromathérapie pour ses vertus toniques mais aussi lymphatiques et veineuses. De plus, elle agirait au niveau psychique. Le bois peut être aussi sculpté et la matière inerte résiduelle après la distillation est utilisée pour fabriquer de l'encens, ingrédient essentiel des rituels hindouistes ou bouddhistes.

Les hommes ne sont pas restés passifs face à cet éventail d'utilisations et depuis la haute Antiquité, ils n'ont cessé d'exploiter les forêts riches en santals. Les européens utilisent le santal, au XVIIIème siècle, comme monnaie d'échange au sein d'un commerce triangulaire pour se procurer le thé de Chine. Les ressources sont pillées et détruites. L'Inde exportait récemment 2000 tonnes de bois et 100 tonnes d'huile, chaque année, vers divers pays. Cependant, sa production est actuellement en forte baisse et risque d'être quasi confidentielle en raison de la destruction des peuplements par un parasite affectant *S. album*. L'économie indienne souffre de ce retournement de situation. En effet, les prix du bois et de l'huile sont très élevés : le prix de vente des billes de la meilleure qualité était en 1990, pour *S. album*, de 10 000 US\$ la tonne... (Collectif 1990).

La forte valeur économique des santals, si elle a contribué au développement de l'aire indo-pacifique, a provoqué la surexploitation de ces arbres. Cet abus se répercute actuellement de deux manières : certaines espèces sont menacées d'extinction ou éteintes, telle *S. fernandezianum* ; d'autres persistent mais sont menacées d'une réduction de leur diversité génétique. En effet, les exploitants privilégient les arbres aux plus belles billes de pied. Le génome s'appauvrit, la sélection se fait en faveur du caractère "peu de bois de coeur" et donc en faveur d'une faible proportion en

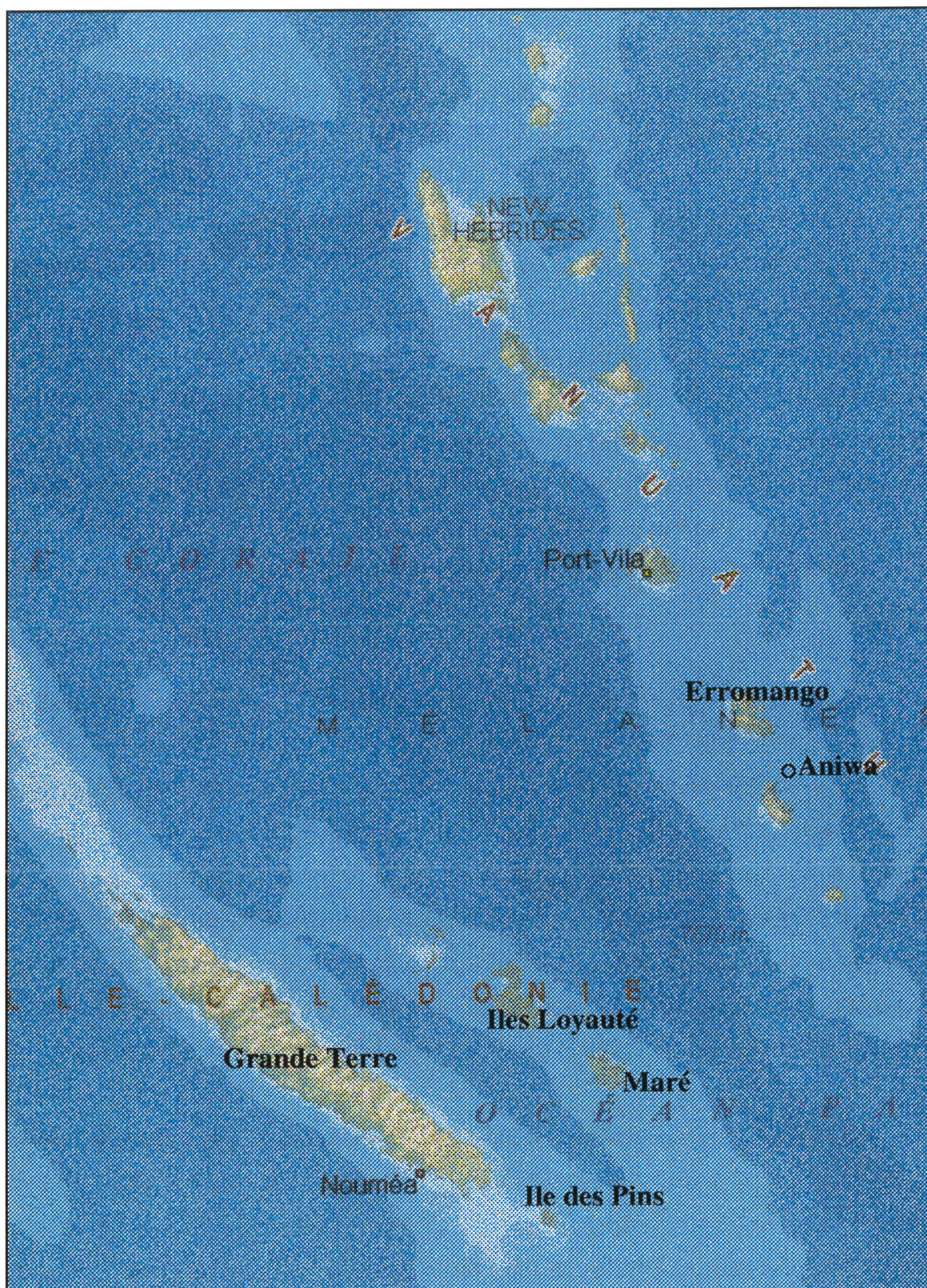


Figure 1 : Vue générale de la Nouvelle-Calédonie et de l'archipel de Vanuatu.
 L'originalité de cette aire de répartition réside dans son organisation en îles.

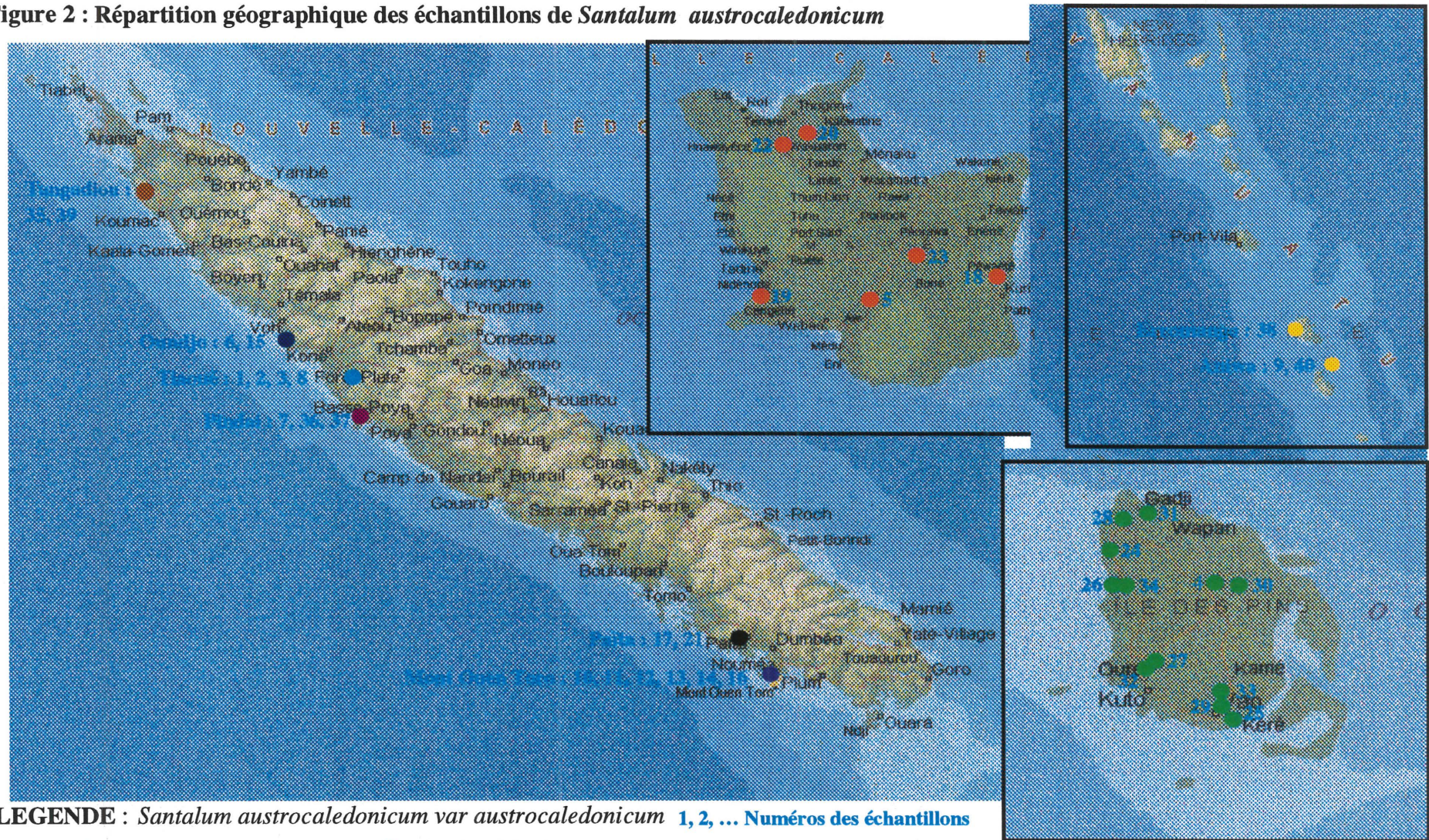
huile essentielle, comme pour *S.album* (Nasi et Ehrhart 1996). Cette réduction de la diversité génétique est un phénomène inquiétant pour ces espèces économiquement et culturellement importantes. Sur le plan international, lors du colloque d'élaboration du "Plan d'action forestier régional sur la diversité génétique forestière" organisé par la FAO à Samoa en avril 1999, le genre santal a été désigné comme l'une des trois "espèces/genres" prioritaires à conserver et à étudier (Butaud et Ehrhart 1999).

Depuis plusieurs années, le CIRAD Forêt de Nouvelle-Calédonie a débuté des recherches sur la gestion des peuplements naturels de santals et sur leur sylviculture. De nombreux travaux ont abouti à une optimisation des méthodes de récolte des graines et la conservation en chambre froide est possible pour certaines provenances. Les travaux engagés sur la levée de dormance et la conduite des semis en pépinière permettent aujourd'hui de produire des plants de qualité pour la plantation. L'étude de la diversité génétique a débuté en 1994 en Nouvelle Calédonie avec la plantation d'essais comparatifs de provenances, de tests de descendance et de vergers à graines de production. La croissance des arbres en plantation est suivie régulièrement.

Afin d'initier une première étude prospective de la variabilité génétique des santals par marqueurs moléculaires, nous utilisons la technique Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) sur du matériel végétal récolté en Nouvelle-Calédonie. Une récolte de feuilles d'individus *S.austrocaledonicum* var *austrocaledonicum* a été organisée sur une vingtaine de provenances situées sur la Grande Terre, l'île des Pins, une des îles Loyauté : Maré et sur l'archipel de Vanuatu (figure 1). Un échantillonnage de *S.austrocaledonicum* var *minutum*, var *pilosulum* et de *S.album* a été également réalisé afin de comparer les différentes espèces ou variétés.

Cette étude donnera des indications sur l'étendue de la variabilité génétique de *S.austrocaledonicum* et sur ses perspectives, comme les échantillonnages à réaliser afin de poursuivre le projet dans lequel s'inscrit ce stage. De plus, elle permettra de caractériser les marqueurs RAPD et d'envisager leur mise en relation avec des analyses chimiques de bois.

Figure 2 : Répartition géographique des échantillons de *Santalum austrocaledonicum*



1. MATERIEL ET METHODES

1.1. MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal utilisé est constitué de feuilles de 42 individus séchées à l'étuve. Certaines résultent d'un échantillonnage de *S.austrocaledonicum* var *austrocaledonicum* réalisé en Nouvelle-Calédonie : sur la Grande Terre (Tiaoué, Pindai, Oundjo), sur l'île des Pins et une des îles Loyauté : Maré. D'autres individus proviennent des îles Erromango et Aniwa de l'archipel de Vanuatu. Des récoltes sur des individus appartenant à deux autres variétés de *S.austrocaledonicum* de la Grande Terre : var *minutum* et var *pilosulum*, et à une autre espèce de santal, *S.album* ont également été effectuées (Figure 2 et annexe n°1) .

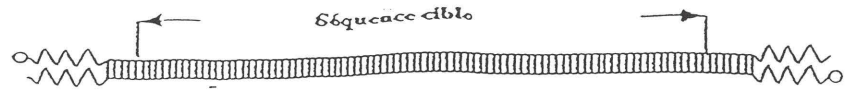
Deux lots de feuilles récoltées dans un verger à graines à Paita (Grande Terre), sur des *S.austrocaledonicum* var *austrocaledonicum*, sont de provenance inconnue (individus 17 et 21). De plus, la taxonomie d'un des individus (36) prélevé en plantation est douteuse : il est morphologiquement difficile de le décrire comme un *pilosulum* ou comme un *austrocaledonicum* en l'absence de floraisons lors des récoltes.

1.2. REVELATION DU POLYMORPHISME MOLECULAIRE

Nous cherchons à mettre en évidence un polymorphisme moléculaire afin d'estimer la variabilité génétique des santals. La technique **RAPD** est retenue pour notre étude. Basée sur le principe de la Polymerisation Reaction Chain (**PCR**), elle consiste en une amplification exponentielle d'un fragment d'ADN encadré par deux amorces identiques, composées de dix nucléotides choisis arbitrairement (figure 3). Les amorces employées contiennent au moins 50 % de guanine et de cytosine, afin d'augmenter la stabilité des fragments d'amplification, ces deux bases étant reliées par trois liaisons hydrogène.

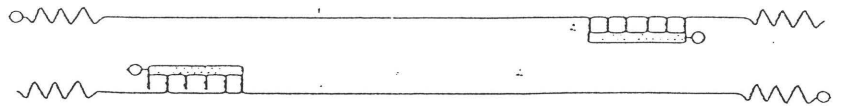
L'amorce va s'hybrider chaque fois que se trouvera dans l'ADN une séquence qui lui est complémentaire. Si deux sites d'hybridation sont à moins de 3000 pb l'un de l'autre et en opposition, c'est-à-dire dans une configuration permettant la PCR, l'amplification aura lieu. Si l'un de ces deux sites est absent dans un autre individu, il n'y aura pas amplification, et un polymorphisme de présence/absence sera observé (De Vienne 1998). La technique RAPD permet ainsi de révéler simultanément une dizaine de loci par amplification.

Cycle 0 ADN cellulaire

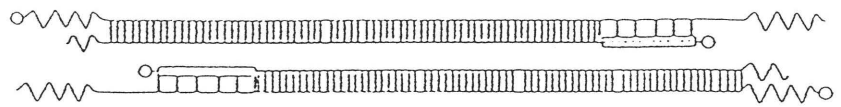


Cycle 1

Dénaturation de l'ADN
et hybridation des amorces



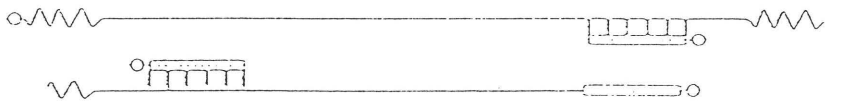
Extension des amorces par
polymérisation des nucléotides
sous l'action de l'enzyme



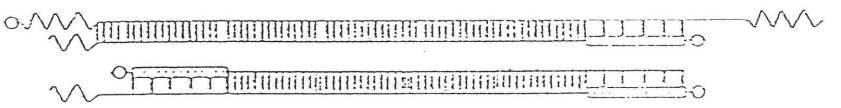
Taq Polymérase

Cycle 2

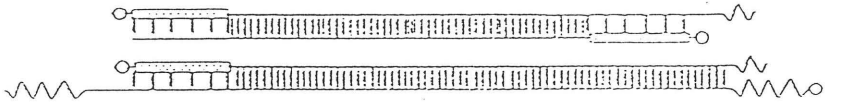
Dénaturation de l'ADN
et hybridation des amorces



Extension des amorces par
polymérisation des nucléotides
sous l'action de l'enzyme



Taq Polymérase



Cycle 1 → 2 copies

Cycle 2 → 4 copies

Cycle n → 2^n copies

Figure 3 : schéma de la réaction d'amplification d'une séquence d'ADN cible par la technique RAPD à partir d'une amorce de 10 nucléotides. En fin de réaction, le nombre de fragments de taille identique (encadrés par deux amorces) est beaucoup plus important que celui des fragments partiellement finis (Verhaegen 1996) .

Après extraction, dosage et amplification de l'ADN selon les conditions de la technique RAPD, la révélation du polymorphisme se fait sur gel d'agarose pour séparer les différents fragments. Elle est suivie d'une coloration au bromure d'éthidium (BET) pour visualiser les fragments amplifiés.

1.2.1. Extraction et dosage de l'ADN

L'ADN a été extrait à partir de 100 mg de feuilles sèches, d'après le protocole modifié de Doyle et Doyle de 1990. On a pris soin de choisir des feuilles juvéniles, les plus vertes possibles. Après extraction de l'ADN des cellules végétales, le fluorimètre est utilisé pour doser les concentrations d'ADN obtenues et préparer les solutions de travail à 3 ng/μl.

1.2.2. Amplification de l'ADN

L'amplification est réalisée sur une microplaque de 96 puits à l'aide d'un thermocycleur Gene AmpPCRSys^{tem} 9600, de la Perkin Elmer Corporation.

➤ *Conditions d'amplification*

Chaque puits de la microplaque contient :

❖ 5 μl de l'ADN matriciel à 3 ng/μl

❖ 20 μl d'un milieu réactionnel comprenant :

- 12.5 μl de tampon 2X associant MgCl₂ 20 mM, Tris HCl 670 mM, (NH₄)₂ (SO₄)²⁻ 166 M, des dinucléotides tri phosphates 5 mM, de la Bovine Serum Albumine 20 mg/ml, un détergent, par exemple W1, du mercapto éthanol.

- 7 μl d'amorce à 2 μM

- 0.2 μl de la **Taq polymérase** obtenue à partir d'une bactérie (**Thermus Aquaticus**) , une enzyme thermostable qui catalyse la synthèse d'ADN à 72° et résiste à 94°. Elle est sensible à la concentration en ion Mg²⁺.

- 0.3 μl d'eau distillée.

Le programme d'amplification est le suivant :

-un cycle de dénaturation de l'ADN de 3 min à 94°

-45 cycles des trois étapes suivantes :

-dénaturation de l'ADN double brin 1 min à 94°

-hybridation des amorces 1 min à 36°

-élongation des fragments 2 min à 72°

-un cycle d'extension finale et de terminaison des amplifications pendant 10 min à 72°.

N.B. : Un témoin d'amplification sans ADN a été réalisé systématiquement pour toutes les amplifications afin de repérer d'éventuelles bandes parasites.

➔ *Choix des amorces*

On isole six individus que l'on va utiliser comme testeurs dans le choix des amorces. Sont retenus les n°5, 9, 10, 34, 35, 42. Diverses amorces sont testées sur ce nombre réduit d'individus. Ainsi, on repère celles fournissant des profils polymorphes et on amplifie tous les individus. Cette procédure de criblage aboutit à l'élimination d'un certain nombre d'amorces.

Les diverses séries ou "kits" d'amorces testées figurent dans l'annexe n°2.

N.B. : Les tests d'amorces établis pour l'Eucalyptus, recherches du programme Arbres et Plantations du CIRAD-Forêt, ont permis de sélectionner plus rapidement les amorces. Cependant, ce principe n'est que très aléatoire puisque *Santalum* et *Eucalyptus* sont deux genres différents.

1.2.3. Electrophorèse et révélation des marqueurs RAPD

Après amplification, 5 µl de bleu de bromophénol sont ajoutés dans les puits de la microplaque afin d'alourdir l'ADN et de contrôler la migration.

➔ *Migration et révélation des marqueurs RAPD*

12 µl de chaque amplificat mélangé au tampon de charge sont prélevés et déposés dans un grand gel d'agarose. Le gel est à 1.8% d'agarose et baigne dans un tampon de migration TBE 0.5X.

Pour un gel de 300 ml à 1.8%, on mélange 5.4 g d'agarose et 300 ml de TBE 0.5 X.

La solution de TBE 0.5X est obtenue en diluant une solution 10X : Tris 0.89M, EDTA (pH 8) 0.2 M, acide borique 0.89 M, eau distillée.

De chaque côté des lignées de puits sont déposés 5 µl de l'échelle de poids moléculaire 1 kb. Cette échelle est utilisée pour mesurer des fragments d'ADN linéaires bicaténaux longs de 0.3 kb à 1.6 kb. Les marqueurs présentant le plus d'intérêt dans notre étude sont localisés pour la plupart entre les bandes 1.636 kb et 0.517 kb.

Une tension électrique de 100 v est appliquée aux extrémités de la cuve. Sous l'action du champ électrique, l'ADN va migrer, les différents fragments se déplaçant d'autant plus facilement entre les mails du gel qu'ils sont petits. Ils vont donc être séparés en fonction de leur taille. Après une migration de 4 heures et quart, le gel est coloré au BET pendant 5 à 15 minutes. Le BET s'intercale entre les bases de l'ADN et permet de visualiser les fragments amplifiés sous ultraviolets à 312 nm.

➔ *Acquisition des données de marquage*

Une fois les gels photographiés, on calcule les poids moléculaires des fragments choisis comme

marqueurs, c'est-à-dire **intenses et répétables**, en fonction des échelles de référence situées sur les bords du gel. **La répétabilité des fragments est contrôlée à travers les tests d'amorces et les amplifications** : il y a six individus qui sont répétés deux fois pour chaque amorce. Une matrice de 1 et de 0 est définie, 1 signifiant la présence de la bande et 0 l'absence de cette même bande, ceci pour chaque individu (annexe n°3). Les fragments RAPD sont identifiés par leur code commercial (Code Opéron) et par la longueur du fragment en paires de bases. Par exemple, le fragment X01-944 est une bande d'une longueur de 944 paires de bases qui a été obtenue avec l'amorce X01. La matrice sera analysée par le Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-pc).

1.3. METHODES D'ESTIMATION DES DISTANCES GENETIQUES A PARTIR DES DONNEES RAPD

Après l'étape de marquage des différents individus, la matrice de données RAPD est établie dans laquelle chaque ligne correspond à un marqueur et chaque colonne à un individu (annexe n°3). L'analyse de la matrice de données vise à classer les différents individus les uns par rapport aux autres, en utilisant des indices de similarité. Ces indices peuvent être ensuite traduits en distances génétiques.

1.3.1. Indices de similarité

Les individus sont comparés deux à deux grâce à des indices de similarité : soit interviennent seulement les coïncidences de 1 (*Jaccard, Dice*), soit les coïncidences de 1 et de 0 (*Sokal et Michener, Rogers et Tanimoto*). Quatre indices ont été retenus parmi les nombreux existants.

En posant :

n = nombre total de marqueurs étudiés dans le tableau de données

a = nombre de marqueurs communs aux deux individus

$b+c$ = nombre de marqueurs pour lesquelles les individus sont différents

d = nombre d'absences de marqueurs communes aux deux individus

$m = a+d$

Indices de similarité utilisant a

Jaccard (1908) = $a / (n-d)$

Dice (1945) = $2a / (2a + b+c)$

Indices de similarité utilisant **m**

Sokal et Michener (1958) = m / n

Rogers et Tanimoto (1960) = $m / (n+b+c)$

Chaque indice de similarité est une valeur comprise entre 0 et 1. Si deux individus ont un indice de similarité proche de 1, ils sont très ressemblants. Par contre, si l'indice avoisine 0, alors les deux individus sont éloignés génétiquement. Les distances génétiques permettent de représenter graphiquement ces caractéristiques.

1.3.2. Distances génétiques calculées à partir des indices de similarité

La formule suivante permet de calculer les distances génétiques :

Distance génétique = 1 - indice de similarité

Ces valeurs sont elles aussi comprises entre 0 et 1. Diverses méthodes de calcul existent, fondées sur des notions de voisinage différentes. Nous utiliserons lors de notre étude les méthodes suivantes :

→ la méthode des Scores. Elle utilise la notion du **voisinage topologique** : pour chaque paire d'individus, un score est calculé en considérant la topologie la plus plausible de l'ensemble des individus. On prend en compte les positions, indépendamment de la grandeur de l'arbre. Les éléments de la paire de score le plus élevé sont considérés comme voisins.

→ la méthode de Neighbor Joining Tree. Elle est basée sur le critère de **voisinage relatif** : la longueur totale de l'arbre doit être minimale. Pour cela, on réunit, à chaque étape, les éléments qui permettent de minimiser la longueur totale de l'arbre de l'étape en cours. A chaque étape, le regroupement de deux éléments permet de diminuer la longueur totale de l'arbre.

→ la méthode UPGMA. Elle fait partie des méthodes de Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) qui correspondent à la définition du voisinage selon la **dissimilarité minimum** (Perrier 1998).

Les méthodes de calcul sont interprétées par le logiciel développé au CIRAD par Xavier PERRIER et Jean-Pierre JACQUEMOND-COLLET en 1998 : Dissimilarité : Analyse et Représentations sous Windows (Darwin) version 3.0 .Les distances génétiques ressortent alors sous forme de **dendrogrammes**.

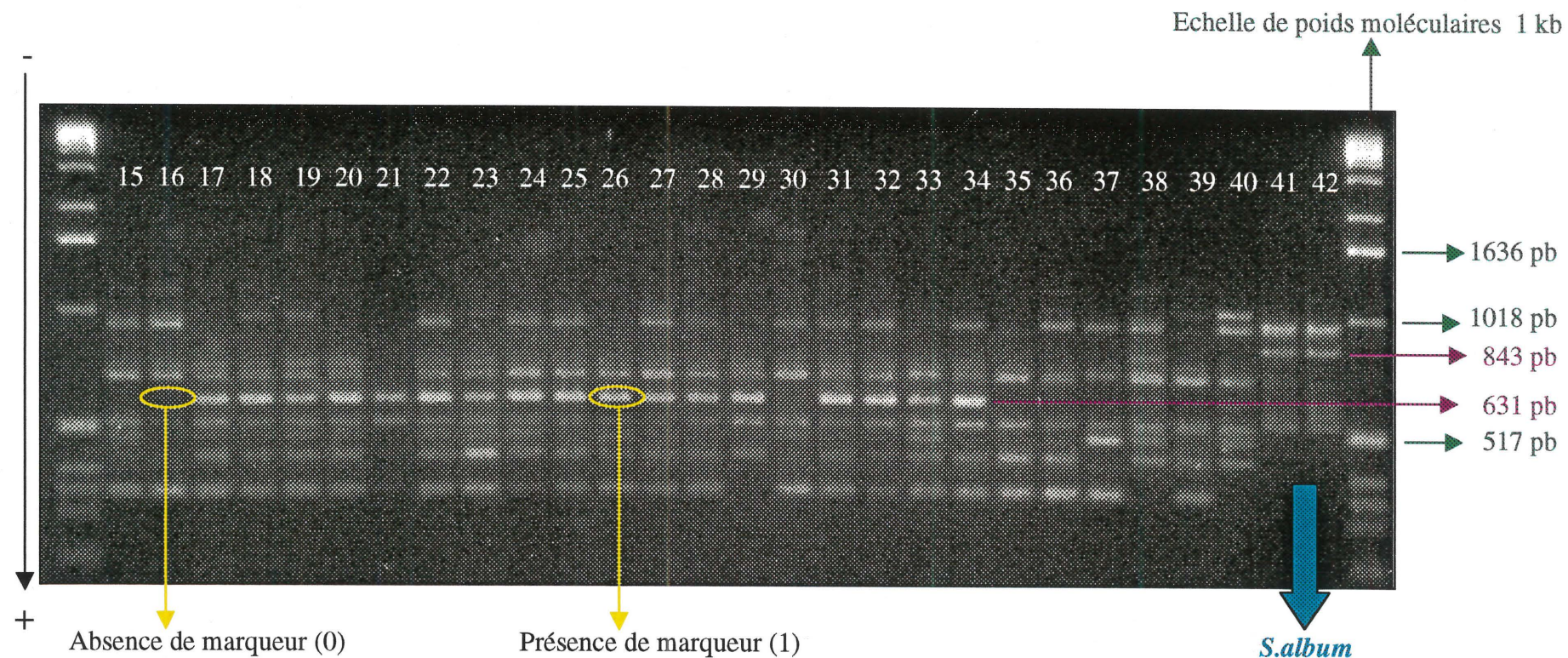


Figure 4 . Mise en évidence du polymorphisme moléculaire à l'aide de la technique RAPD. La photographie du gel d'agarose représente 28 des 42 individus et l'amorce arbitraire utilisée est l'amorce W02. Les profils des deux individus *S.album* (41 et 42) diffèrent nettement de ceux des individus *S.austrocaledonicum* .

2. RESULTATS

Parmi toutes les amorces testées pour mettre en évidence un polymorphisme moléculaire (figure 4), 82% sont amplifiées et 41% sont informatives c'est-à-dire qu'elles permettent de visualiser en moyenne cinq marqueurs polymorphes. Cela correspond à 54% de la totalité des marqueurs révélés (annexe n°2).

L'étude précise de la matrice de données de 0 et de 1 permet de distinguer des marqueurs spécifiques à certaines provenances ou variétés et d'autres communs à deux provenances en particulier (annexe n°4). La matrice peut être étudiée dans sa totalité ou partiellement, en supprimant les marqueurs spécifiques.

2.1. ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE A PARTIR DE LA MATRICE DE DONNEES TOTALE

Dans un premier temps, l'étude porte sur la totalité des marqueurs. Les dissimilarités entre espèces sont fortes et les deux individus *S. album* (41, 42) se distinguent nettement des autres (annexe n°5). Afin de faciliter la lecture des dendrogrammes et d'orienter l'étude sur la diversité génétique des *S. austrocaledonicum*, les individus 41 et 42 sont éliminés de la matrice. Cependant, les nombreux marqueurs uniquement présents ou absents chez cette espèce (X01_843, X04_982, X17_657, X18_909, B17_479, B17_396, W18_1488, W18_903, Y07_1018, B15_539, W20_695, Y20_624, Y20_601, Y20_344, W02_843, W16_812, W16_427, W13_344, W01_1174, W07_763, W06_495, W09_624, Y06_597, Y06_517, Y20_699, Y20_648, W05_396, W03_753, W03_618, W03_579) sont conservés afin d'étudier objectivement la matrice de données, dans sa totalité. De plus, les deux individus appartenant à la variété *minutum* (35, 39) sont maintenus dans les diverses représentations bien qu'étant toujours à l'écart des autres.

2.1.1. Emploi de plusieurs indices avec la méthode de calcul des Scores

On constate avec l'indice de similarité de Dice (figure 5a) que les individus se regroupent selon trois branches principales réparties ainsi :

- Maré et quelques individus de l'île des Pins
- Vanuatu, Tiaoué, Oundjo, la variété *minutum* et quelques individus de l'île des Pins
- la variété *pilosulum* provenant de Ouen Toro et le reste de l'île des Pins.

5a : Indice de similarité de Dice

LEGENDE :

variété *australocaledonicum* :

Archipel de Vanuatu

Tiaoué

Oundjo

Pindai

île des Pins

Maré

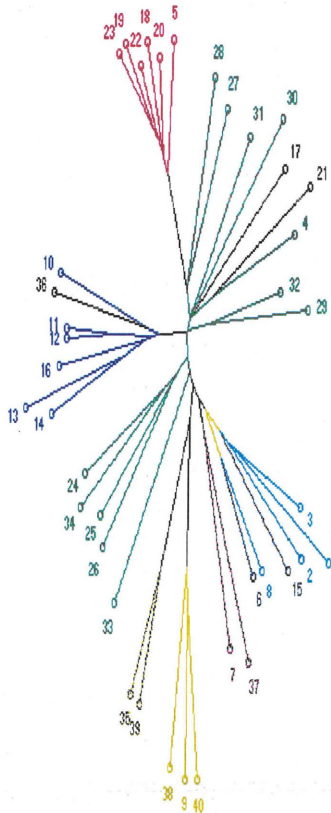
provenance inconnue

variété *pilosulum*

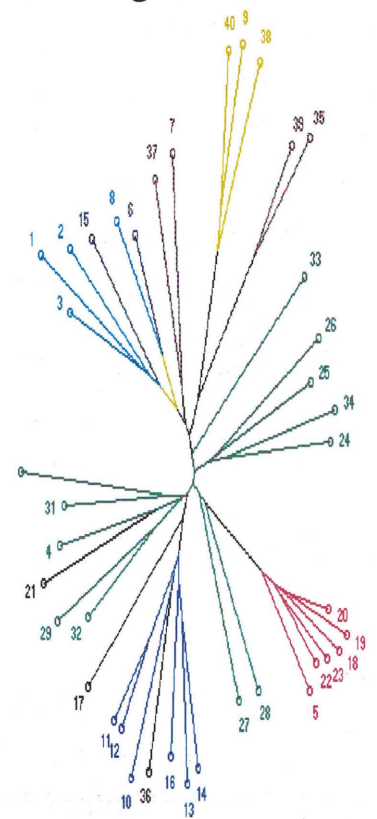
variété *minutum*



5b : Indice de Jaccard



5d : indice de Rogers et Tanimoto



5c : Indice de Sokal et Michener

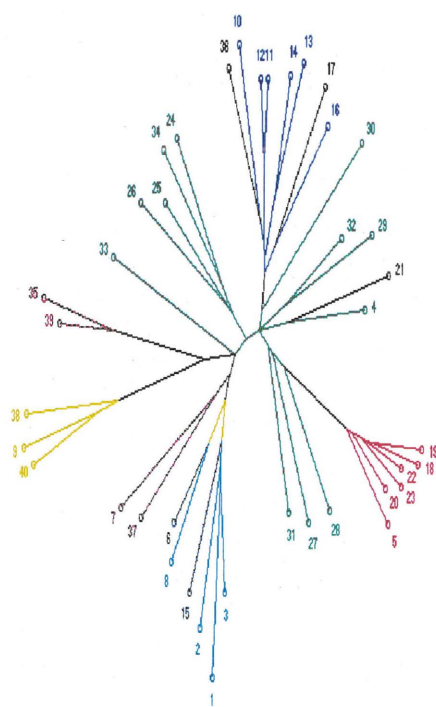


Figure 5 : Dendrogrammes obtenus pour différents indices avec la méthode des Scores.

Dans chaque branche, il y a des sous-ensembles très marqués, selon les variétés mais aussi selon la provenance. Un code couleur permet une lecture facilitée des représentations :

- en rouge, les individus de Maré
- en vert, ceux de l'île des Pins
- en jaune, ceux de l'archipel de Vanuatu
- en bleu clair, ceux de Tiaoué et d'Oundjo (Grande Terre Nord)
- en violet, ceux de Pindaï (7, 37)
- en bleu foncé, les individus de la variété *pilosulum*, provenant de Ouen Toro
- en marron, ceux de la variété *minutum* (35, 39)
- en noir, les individus de provenance inconnue.

Les individus de Vanuatu, de Maré et ceux de la variété *pilosulum* forment des groupes bien séparés des autres, tandis que les individus de l'île des Pins se répartissent dans une large gamme de variabilité. Les individus de Pindaï sont proches de ceux de la Grande Terre nord. Les individus de Vanuatu et ceux appartenant à la variété *minutum*, dont la différenciation est très nette, sont les deux groupes les plus distants.

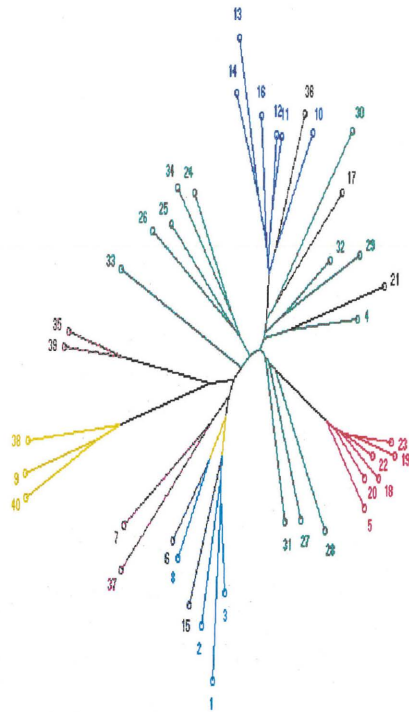
On peut déjà estimer la provenance des individus en noir, grâce aux groupes auxquels ils se rattachent : les 17 et 21 viendraient de l'île des Pins et le 36 appartiendrait à la variété *pilosulum*. Les dendrogrammes des trois autres indices de similarité (figure 5) confirment les résultats précédents : il y a donc une uniformité malgré l'emploi d'indices différents. On note cependant qu'avec les indices de Sokal et Michener et de Rogers et Tanimoto, l'individu 17 se trouve avec la variété *pilosulum*, et non avec l'île des Pins.

La répartition des distances génétiques selon leur valeur statistique (soit 780 valeurs) appuie l'homogénéité des résultats (annexe n°6). Quel que soit l'indice de similarité utilisé, les distances génétiques varient entre 0.07 et 0.70 et les profils restent très voisins. Notons que la moyenne obtenue avec l'indice de Jaccard diverge significativement des autres moyennes.

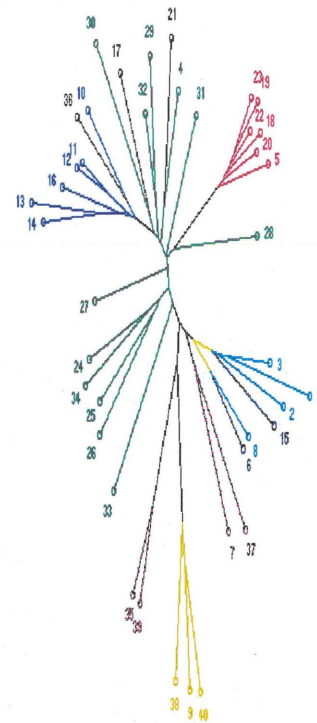
2.1.2. Emploi de plusieurs méthodes de calcul avec l'indice de Dice

Les différentes méthodes de calcul (figure 6) donnent des dendrogrammes qui respectent les groupes cités auparavant : Maré, Vanuatu s'individualisent nettement, tandis que les individus de l'île des Pins se répartissent largement. Par contre, avec la méthode des Scores ordinaux, l'ensemble de la Grande Terre Nord et celui de la variété *pilosulum* sont voisins. La provenance douteuse de certains individus se confirme : le 36 intègre la variété *pilosulum*, les 17 et 21 viennent

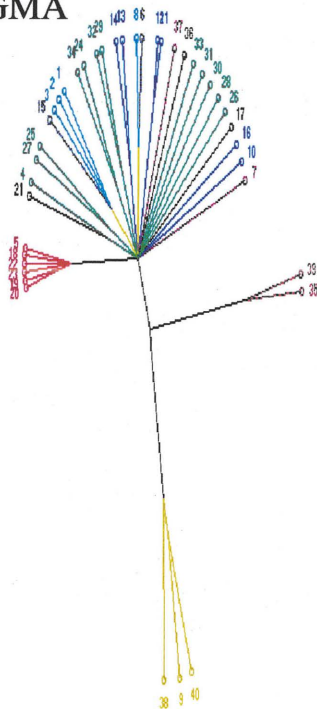
6a : Scores



6b : Neighbor Joining



6c : UPGMA



6d : Scores Ordinaux

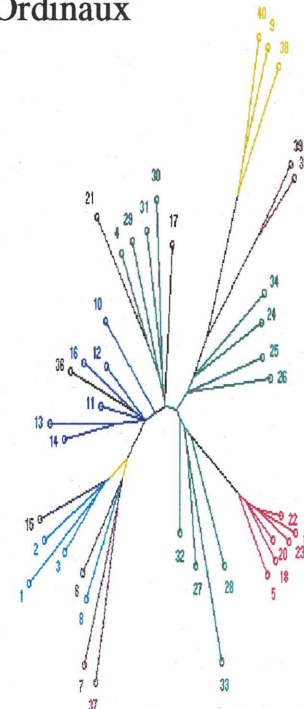
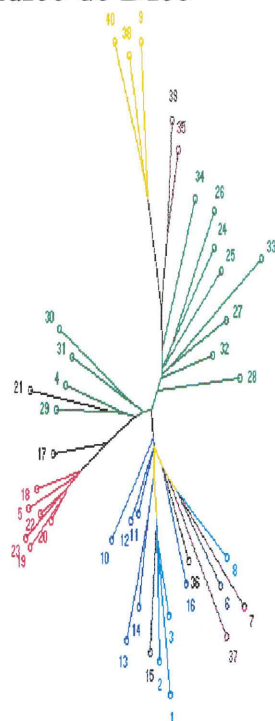
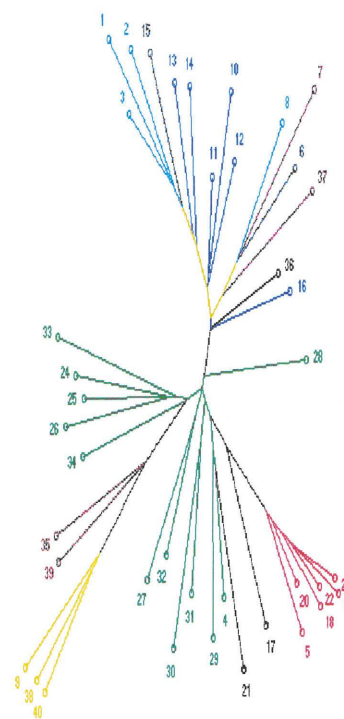


Figure 6 : Dendrogrammes obtenus par différentes méthodes de calcul avec l'indice de Dice.

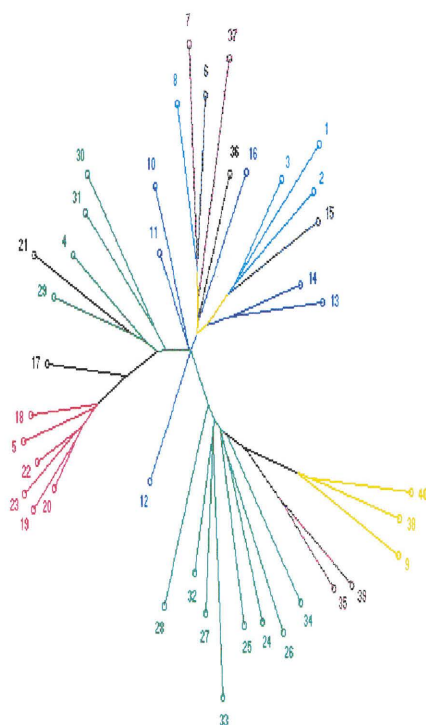
7a : Indice de Dice



7b : Indice de Sokal et Michener



7c : Indice de Jaccard



7d : Indice de Rogers et Tanimoto

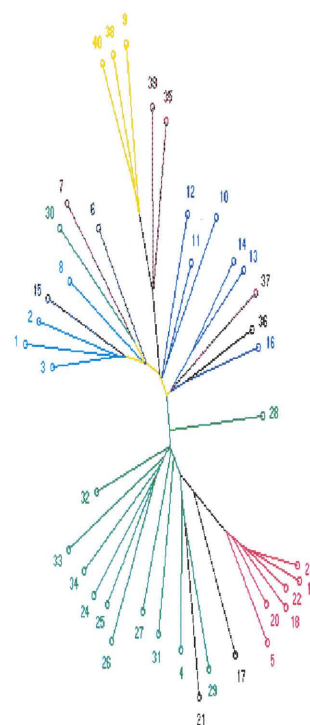


Figure 7 : Dendrogrammes obtenus pour différents indices sur une matrice de données de 76 marqueurs non spécifiques à une provenance ou une variété. Méthode des Scores Ordinaux.

de l'île des Pins.

La représentation particulière donnée par la méthode UPGMA semble liée à un mode de calcul particulier du logiciel et n'est pas exploitée.

Quelle que soit la méthode de calcul ou l'indice de similarité employé, les résultats mettent en évidence les mêmes groupes : la structuration génétique de l'espèce est très forte.

2.2. ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE A PARTIR D'UNE MATRICE DE DONNEES PARTIELLE

Tous les marqueurs spécifiques des différentes provenances et ceux communs à deux provenances sont supprimés de la matrice initiale. Il reste donc 76 marqueurs qui semblent non spécifiques.

La méthode de calculs est cette fois celle des Scores Ordinaux, sur laquelle sont testés les quatre indices. Les individus de Maré, de Vanuatu et ceux appartenant à la variété *minutum* forment toujours des groupes distincts et l'île des Pins un groupe plus diffus. Les liaisons restent donc les mêmes mais la Grande Terre (la variété *pilosulum* et la Grande Terre Nord) ne forme qu'un seul ensemble avec les indices de Dice et de Sokal et Michener (figure 7). Par contre, l'indice de Rogers et Tanimoto présente toujours la variété *pilosulum* bien distincte des autres. L'individu 36 demeure affilié à ce taxon et le 17 à l'île des Pins, tandis que le 21 oscille cette fois-ci entre Maré et l'île des Pins.

Nous aurions pu nous attendre à beaucoup moins de clarté dans les représentations, après le retrait des marqueurs spécifiques. Cependant, la structure proposée par le couple indice de Dice / méthode de calcul des Scores est conservée.

3. DISCUSSION

Les résultats obtenus soulignent plusieurs points qu'il est bon de développer. Tout d'abord, la technique RAPD présente des avantages mais aussi quelques limites. Notre réflexion peut ensuite s'orienter sur les différents indices et méthodes de calcul et leur impact sur les dendrogrammes. Enfin, l'analyse de la diversité au sein de *S. austrocaledonicum* permet d'ouvrir des perspectives comme la nécessité d'élargir les échantillonnages.

3.1. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA TECHNIQUE RAPD

La technique RAPD présente certains avantages tels son faible coût, sa rapidité de mise en oeuvre, le peu d'ADN demandé et le nombre élevé de marqueurs générés. Elle permet également de détecter un polymorphisme moléculaire chez des espèces où ni des sondes ni des marqueurs PCR n'ont été développés. Pourtant, cette technique reste très critiquée dans la littérature, notamment pour son manque de répétabilité (Rabouam *et al* 1999). Cependant, en répétant deux fois systématiquement six individus et en choisissant les fragments les plus intenses, nous avons pratiquement éliminé les risques d'erreur. Le choix des fragments a été minutieux : il ne représente qu'un peu plus de la moitié de la totalité des marqueurs présents à chaque amplification.

Une autre limite de la technique RAPD est la présence de bandes parasites. Elles peuvent être dues à des fragments réarrangés pendant la réaction PCR ou aux génomes d'organismes commensaux comme des virus, des bactéries, des protozoaires (Rabouam *et al* 1999). Là aussi, le choix des fragments permet de minimiser les risques.

Enfin, la technique RAPD fournit des marqueurs dominants qui ne permettent pas de distinguer les homozygotes et les hétérozygotes.

3.2. IMPACT DES DIFFÉRENTS INDICES DE SIMILARITE ET METHODES DE CALCUL SUR LES DENDROGRAMMES

Les différents dendrogrammes obtenus avec les quatre indices et la méthode de calcul des Scores sont dus à l'importance relative donnée aux marqueurs. Ainsi, l'indice de Jaccard ne tient vraiment compte que des marqueurs communs aux deux individus et donne un poids égal aux différents termes considérés. De ce fait, c'est l'indice le moins probant et donnant le dendrogramme le moins représentatif : les dissimilarités apparaissent moins nettement.

L'indice de Dice accentue les dissimilarités en donnant un poids deux fois plus élevé à la double présence, celui de Rogers et Tanimoto un poids double aux marqueurs pour lesquels les individus sont différents. Quant à l'indice de Sokal et Michener, il prend en compte tous les marqueurs et cela de manière égale. Ces indices sont les plus aptes à fournir des profils représentatifs des dissimilarités existant entre les individus.

Cependant, malgré les formules divergentes des indices, les représentations montrent une certaine uniformité : les marqueurs analysés sont représentatifs d'une **forte structuration génétique**.

En dépit des différentes notions de voisinage adoptées par les méthodes de calcul, les dendrogrammes donnent des représentations voisines de la variabilité génétique de *S. austrocaledonicum*. Les algorithmes ne permettent pas de troubler la structuration génétique : c'est un argument de plus pour démontrer la solidité de cette structuration.

3.3. DIVERSITE GENETIQUE AU SEIN DE *S. austrocaledonicum*

Au sein de l'espèce *austrocaledonicum*, les variétés sont nettement distantes les unes des autres, surtout *minutum* et *pilosulum* qui se distinguent de la variété *austrocaledonicum*. Cette dernière possède une gamme de variabilité plus étendue. Les taxons *pilosulum* et *minutum* montrent une diversité génétique réduite : dans tous les cas, le groupe reste bien individualisé. L'échantillonnage de *minutum* n'ayant été réalisé que sur deux individus, on peut difficilement extrapoler ce résultat à toute la variété. L'exemple de *pilosulum* est plus convaincant car il est fondé sur six individus.

A l'intérieur de la variété *austrocaledonicum*, on distingue plusieurs types de variabilité. Sur l'île de Maré, la diversité génétique est faible : les individus forment un groupe très compact. L'échantillonnage ayant été réalisé de manière bien homogène sur tout ce territoire, on peut penser qu'un plus grand nombre de récoltes n'aurait pas apporté plus d'informations au sein du groupe. A l'opposé, l'île des Pins, aussi petite soit elle, présente plus de variabilité que n'importe quelle terre alentour. Le nombre d'individus relativement important appuie cette caractéristique. Les autres groupes qui apparaissent très soudés (Grande Terre Nord, Vanuatu) présentent une faible diversité. Cependant, dans le cas de l'archipel de Vanuatu, comme pour la variété *minutum*, le nombre d'échantillons est trop restreint pour pouvoir tirer de solides conclusions et ne concerne que deux îles sur les six ou sept où le santal a été signalé.

Notre étude de diversité permet d'établir l'appartenance de l'individu 36 à la variété *pilosulum* et de donner comme origine à l'individu 21 l'île des Pins, ceci de manière sure. Par contre, la provenance du n° 17 reste douteuse. Une recherche de variabilité génétique permet donc de lever le doute, au moins en partie, sur la provenance de certains échantillons. Elle permet également de définir les liens phyllogéniques entre les individus. Ainsi, les résultats obtenus pour l'île de Maré présentent un intérêt dans l'éclaircissement d'incohérences taxonomiques : dans un rapport interne du CIRAD Forêt, Robert Nasi propose de différencier les santals des îles Loyauté auxquelles appartient Maré, et ceux de la Grande Terre, à la morphologie et au comportement très différents mais pourtant réunis actuellement dans le même taxon (variété *austrocaledonicum*). R. Nasi conçoit la création d'une autre variété : *Loyaltensis*, qui remplacerait var *austrocaledonicum* des îles Loyauté. L'aspect très différencié du groupe de Maré et la structuration génétique très forte permettent d'envisager une analyse génétique plus approfondie afin d'argumenter cette nouvelle théorie.

3.4. PERSPECTIVES APORTEES PAR LES RESULTATS

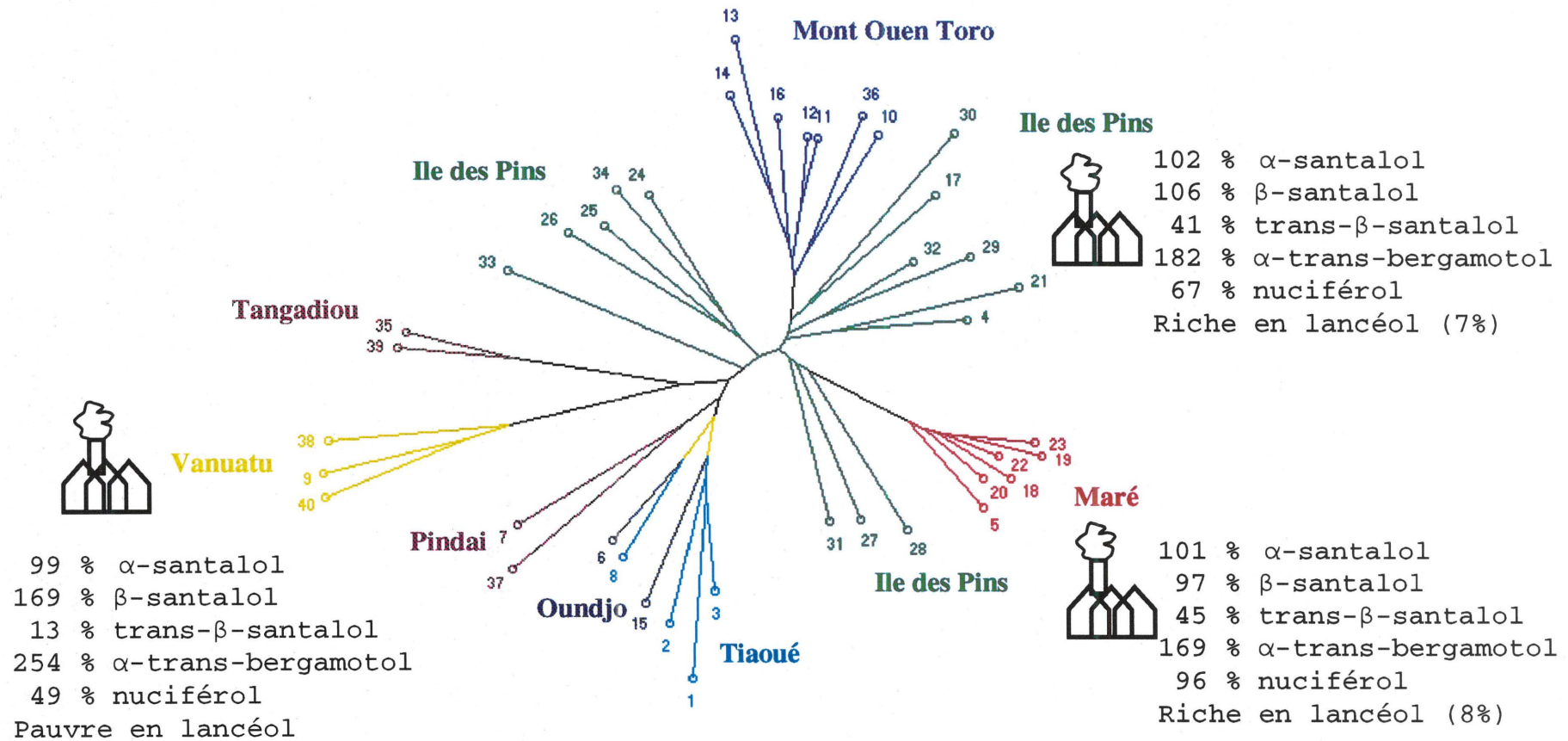
Les résultats obtenus démontrent la nécessité d'élargir l'échantillonnage et peuvent être mis en relation avec des analyses chimiques de composition des bois.

3.4.1. Nécessité d'élargir les données et les échantillonnages

Cette première expérimentation s'est limitée à un nombre relativement faible d'individus (soit 42). L'échantillonnage ne permet pas dans tous les cas de tirer des conclusions satisfaisantes s'appliquant à des populations entières. Ce n'était d'ailleurs pas son objectif premier. Une étude plus poussée de la variabilité génétique de *S. austrocaledonicum* nécessiterait un échantillonnage plus précis pour amasser le maximum d'informations. Ainsi, il serait intéressant de récolter plusieurs échantillons sur chacune des îles de l'archipel de Vanuatu et de faire de même pour les îles Loyauté auxquelles appartient Maré. On pourrait ainsi évaluer l'étendue de la variabilité sur des îles relativement voisines.

Il faudrait également échantillonner plus globalement la variété *minutum* pour laquelle on ne dispose, dans cette étude, que de deux individus. La Grande Terre est aussi concernée : les récoltes n'ont pas été suffisamment réparties, notamment en son centre. L'extension aux îles Cook, aux îles Marquises et plus largement à toute la Polynésie Française où sont décrites sept variétés de

Figure 8 : Représentation de la diversité génétique du Santal de Nouvelle Calédonie
Caractéristiques chimiques des huiles (référence *Santalum album* Base 100)



S.insulare peut également être envisagée.

Notre étude, limitée à un nombre réduit d'individus, est prospective. Elle pourra s'étendre par la suite, les premiers résultats obtenus étant encourageants.

3.4.2. Relation entre les résultats et des analyses chimiques de composition des bois

Nous avons mis en évidence par marquage moléculaire la variabilité génétique chez différents individus du genre *Santalum*. Parallèlement, l'Université Française du Pacifique réalise des analyses chimiques sur des éprouvettes de bois afin d'apporter des informations sur la composition de l'huile en fonction des espèces et des lieux de récoltes des échantillons. Cette étude concerne entre autres des échantillons provenant de l'île des Pins, de Maré et d'Erromango de l'archipel de Vanuatu. Cette dernière se distingue, soit dans les maximum soit dans les minimum, des deux autres îles aux valeurs voisines (figure 8 et annexe n°7). Chaque provenance possède des molécules qui lui sont propres et qui la distinguent des autres mais d'un point de vue général, les huiles des diverses provenances présentent les **mêmes molécules** mais **en des proportions variables** (Alpha 1997). Cette variabilité biochimique et la production de bois et d'huiles essentielles elle aussi variable (les santals de l'île des Pins fournissent jusqu'à deux fois plus d'huile que ceux de Maré) pourront être mis en relation avec la variabilité génétique et les marqueurs RAPD.

A long terme, compte tenu de l'accroissement rapide des banques de données de séquençage de gènes, il sera possible d'étudier directement les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des huiles essentielles. La technique Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) est déjà utilisée avec succès sur les eucalyptus au laboratoire du CIRAD Forêt pour les gènes de biosynthèse des lignines qui ont été positionnés sur des cartes génétiques. Les premiers résultats montrent une bonne relation entre la variabilité des gènes et la mesure des caractères quantitatifs liés à l'action de ces gènes. Une application de ce type pour les gènes de biosynthèse des huiles essentielles n'est donc pas utopique, mais laisse au contraire entrevoir des possibilités d'intégration de ces informations pour une meilleure gestion de la variabilité génétique du santal.

CONCLUSION

Cette première étude par marqueurs moléculaires de la variabilité génétique du santal en Nouvelle-Calédonie a permis d'estimer sa diversité inter et intra variétale. Les résultats obtenus permettent de poursuivre le projet dont l'objectif ultime est la mise en place d'une gestion durable des ressources génétiques. En effet, les connaissances acquises à la fin de ce projet de recherche, pour le genre *Santalum* dont le modèle en îles est original (Nouvelle-Calédonie, Polynésie française), permettront d'adapter des stratégies de protection *in situ* des peuplements naturels existants et de proposer des méthodes de conservation *ex situ* de la diversité génétique. Les populations ainsi créées auront une large base génétique et constitueront un réservoir génétique riche pour garantir la production de plantations de qualité et bien identifiées. Les connaissances acquises permettront de faire des propositions afin de restaurer la ressource génétique lorsqu'elle est très menacée, de proposer des plans d'enrichissement des forêts claires et des friches sur les îles de manière à constituer un potentiel d'avenir. Le santal est un des meilleurs moyens de valorisation des zones forestières secondarisées de ces îles du Pacifique et des zones de corail exondé à sol squelettique. Ces dernières sont très fréquentes sur les atolls et les îles coralliennes où toute autre mise en valeur économique est exclue. La préservation du santal fournira une source de revenus aux populations des îles soit directement par l'exploitation du bois, soit sous forme de main d'oeuvre employée par de petites unités locales de transformation en huiles essentielles ou en produits d'artisanat à forte valeur ajoutée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALPHA J. , 1997. Etudes des concrètes et des essences de santal d'origine océanienne. Elucidation de nouveaux sesquiterpenoïdes par la RMN multi-impulsionnelle et bidimensionnelle. Thèse de 3ème cycle. Université Française du Pacifique à Papeete, Polynésie Française.

BUTAUD J. F. and EHRHART Y., 1999. The sandalwood in the Marquesas Islands. Communication au "Séminaire régional d'élaboration du plan d'action forestier régional sur la diversité génétique forestière", Apia, FAO (actes à paraître) .

COLLECTIF, 1990. Sandalwood in the Pacific : A state-of knowledge and summary from the april 1990 symposium. Proceedings of the symposium on sandalwood in the Pacific, Honolulu, Hawaii, april 9-11, 1990. General technical report PSW-122, Pacific Southwest Research Station, Hawaii, 1-11.

DE VIENNE D., 1998. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. . coédition INRA-CNED : 35-37.

DOYLE J.J. and DOYLE J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12 :13-15.

EHRHART Y., 1997. Descriptions of some sandal tree populations in the south west pacific : consequences for the silviculture of these species and provenances. *In*: Sandal and its products. International Seminar, Bangalore, India, 18-19 december 1997. ACIAR Proceedings 84 : 105-112.

EHRHART Y. et NASI R., 1996 a. Le santal, un parfum de prospérité- 1 ère partie: une longue histoire. Bois et forêts des tropiques 247 : 5-19.

EHRHART Y. et NASI R., 1996b. Le santal, un parfum de prospérité- 2 ème partie: les plantations. Bois et forêts des tropiques 248 : 5-16.

HALLE N., 1988. Santalaceae. *In*: Flore de la Nouvelle-Calédonie et dépendances. Museum National d'Histoires Naturelles, Paris. Volume 15 : 99-113.

JACQUEMOND-COLLET J. P. et PERRIER X., 1998. Dissimilarité : Analyse et Représentations sous Windows version 3.0 . Logiciel CIRAD.

NASI R., 1995. Le genre *Santalum* en Nouvelle-Calédonie. Rapport interne du CIRAD Forêt : 1-24.

PERRIER X., 1998. Analyse de la diversité génétique : mesures de dissimilarité et représentations arborées. Thèse de 3 ème cycle. Université Montpellier II : 99-107.

RABOUAM C. *et al*, 1999. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology* 8 : 493-503.

RADOMILJAC A.M., McCOMB J.A., 1997. Nitrogen-fixing and non-nitrogen-fixing woody host influences on the growth of the root hemi-parasite *Santalum album* L. *In*: Sandal and its products. International Seminar, Bangalore, India, 18-19 december 1997. ACIAR Proceedings 84 : 54-57.

ROHF F.J., 1995. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1.80 : 7-15, 7-16.

SHANKARANARAYANA K.H. *et al*, 1997. Content and composition of oil from the central and transition zones of the sandalwood disc. *In*: Sandal and its products. International Seminar, Bangalore, India, 18-19 december 1997. ACIAR Proceedings 84 : 86-88.

VERHAEGEN D. , 1996. Prédiction des valeurs génétiques, cartographie génétique et recherche de QTL dans un croisement interspécifique *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis*. Thèse de 3 ème cycle. Université de Paris-Sud, Orsay : 13-15, 23-26.

ANNEXES

Annexe n° 1 : Liste des individus de l'échantillonnage

a : *S.austrocaledonicum* var *austrocaledonicum*

provenance	localisation du site	n°ech	caractéristiques morphologiques (m)				observations
			hauteur	bille de pied	tronc	diamètre du tronc	
Tiaoué Grande Terre	164°58' E 21°10.8' S	1	9 à 10	3	5	0,18	feuilles assez rondes et larges
		2	10	3	5 à 6		tronc creux sur un côté sur 4 ou 5 m
		3	10			0,30 à 0,35	arbre creux avec des rejets de la souche. Feuilles assez rondes
		8		2	3	0,3	arbre droit, mûr, écorce crevassée
Pindai Grande Terre	164°98, 13' E 21°20' S	7	inf à 4,5	1,5	2,5	0,08	jeune santal de franc pied en forêt sèche
		37	6	2	4	0,1	arbre de franc pied
Oundjo Grande Terre Nord	164°40.85' E 21°01.11' S 164°40.5' E 21°00, 55' S	6	3				petites fleurs. Végétation Gaïac
		15					cuirasse désarticulée du santal serpentines, végétation Gaïac, Backra, Casuarina equisetifolia
Maré îles Loyauté		5	4				rejets multiples
		18	4			0,11	rejet de racines centre d'un bosquet plus ou moins forestier de 8 à 9 m de haut
		19	6 à 7	1,8	3	0,2	belle bille, bel arbre, écorce bien réticulée
		20	6	2	4	0,13	
		22	5 à 6	1,6	1,6	0,175	
		23					santal buissonnant avec des rejets multiples après feux fréquents
Ile des Pins							végétation : beaucoup de goyaves
		4	6			0,1	
		24		1,8		0,28 à 0,29	très beau tronc très cylindrique
		25				0,1 à 0,12	très bel ensemble de gros arbres de diamètre 40 cm
		26	12	3		0,28	branches à partir de 5 m
		27					
		28	4			0,07	jeune arbre
		29					santal rampant aux 3/4 à l'ombre
		30					
		31					jeune santal
		32					
		33				0,05	rejets ou drageons
Vanuatu	169°36' S 19°16' E 169°13' E 18°50' S 169°36' S 19°16' E	9				0,2	
		38					
		40					
Inconnue		17					Collection de Paita
		21					Collection de Paita

b : *S.austrocaledonicum* var *pilosulum*

provenance	localisation du site	n°ech	caractéristiques morphologiques (m)				observations
			hauteur	bille de pied	tronc	diamètre du tronc	
Ouen Toro Grande Terre		10					
		11					
		12					
		13	7	1,5	4	0,25	
		14					jeune plant
		16	5	1,2	1,2	0,21	

c : *S.austrocaledonicum* var *minutum*

Tangadiou Grande Terre	164°14' E 20°31.5' S	35	3				
		39					

d : *S. album*

inconnue		41	6	1	3	0,08	Collection de Paita
		42	5 à 6	1,5	1,8	0,11	Collection de Paita

e : *S. austrocaledonicum* var *austrocaledonicum* ? var *pilosulum* ?

inconnue		36					
----------	--	----	--	--	--	--	--

Annexe n° 2 : Amorces testées et utilisées pour les RAPD

NOM		NOMBRE TOTAL D'AMORCES			NOMBRE DE MARQUEURS	
Kit	Amorces RAPD	Testées	Amplifiées	Informatives	Total	Polymorphes
A	A09	1	0	0		
B	B11, B15, B17, B20	4	3	2	16	13
I	I16	1	1	0		
J	J06, J18	2	2	0		
R	R17	1	0	0		
S	S10	1	0	0		
U	U07, U19	2	1	0		
W	W01 à 20	20	17	13	124	63
X	X01, X03, X04, X06, X07, X11, X17, X18 X20	9	9	7	60	37
Y	Y01 à Y20 sauf Y17	19	15	5	43	23
Z	Z03, Z06, Z09, Z10, Z12, Z14	6	6	0		
Total		66	54	27	253	136

Annexe n°3 : Matrice partielle des données RAPD.

[illegible]

Annexe n°4 : Marqueurs spécifiques

Les numéros des individus figurent entre parenthèses.

a- Marqueurs spécifiques des différentes provenances

Variété	Provenance	Marqueur RAPD	Nombre d'individus		
			avec le marqueur	sans le marqueur	total
minutum	Tangadiou	W06_792 +	2 (35, 39)	0	2
		W06_691 +	2 (35, 39)	0	2
austrocaledonicum	Vanuatu	Y13-790 +	3 (9, 38, 40)	0	3
		Y18_765 -	0	3 (9, 38, 40)	3
		B17_606 +	3 (9, 38, 40)	0	3
		W02_1110 +	2 (9, 40)	1 (38)	3
	Maré	B15_256 -	0	5 (5, 18, 19, 20, 22, 23)	6
		W19_938 +	6 (5, 18, 19, 20, 22, 23)	0	6
		W13_935 +	6	0	6
		X11_452 -	0	6	6
		Y06_739 -	0	6	6
		W03_361 +	4 (18, 19, 22, 23)	2 (5, 20)	6
	Pindai	X01_1263 +	2 (7, 37)	0	2
	Oundjo	W03_624 +	1 (15)	0	1
	Tiaoué	X17_740 +	3 (1, 3, 8)	1 (2)	4
	Grande Terre	X04_1437 -	0	15	15
	Ile des Pins	Y20_473 +	2 (24, 34)	11 (4, 21, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33)	13
		W16_1018 +	3 (29, 32, 33)	10	13
pilosulum	Ouen Toro	W01_240 +	5 (11, 12, 13, 14, 16)	1 (10, 36)	7
		X11_495 +	2 (11, 12)	5 (10, 13, 14, 16, 36)	7
		X17_517 +	2 (10, 36)	5 (11, 12, 13, 14, 16)	7

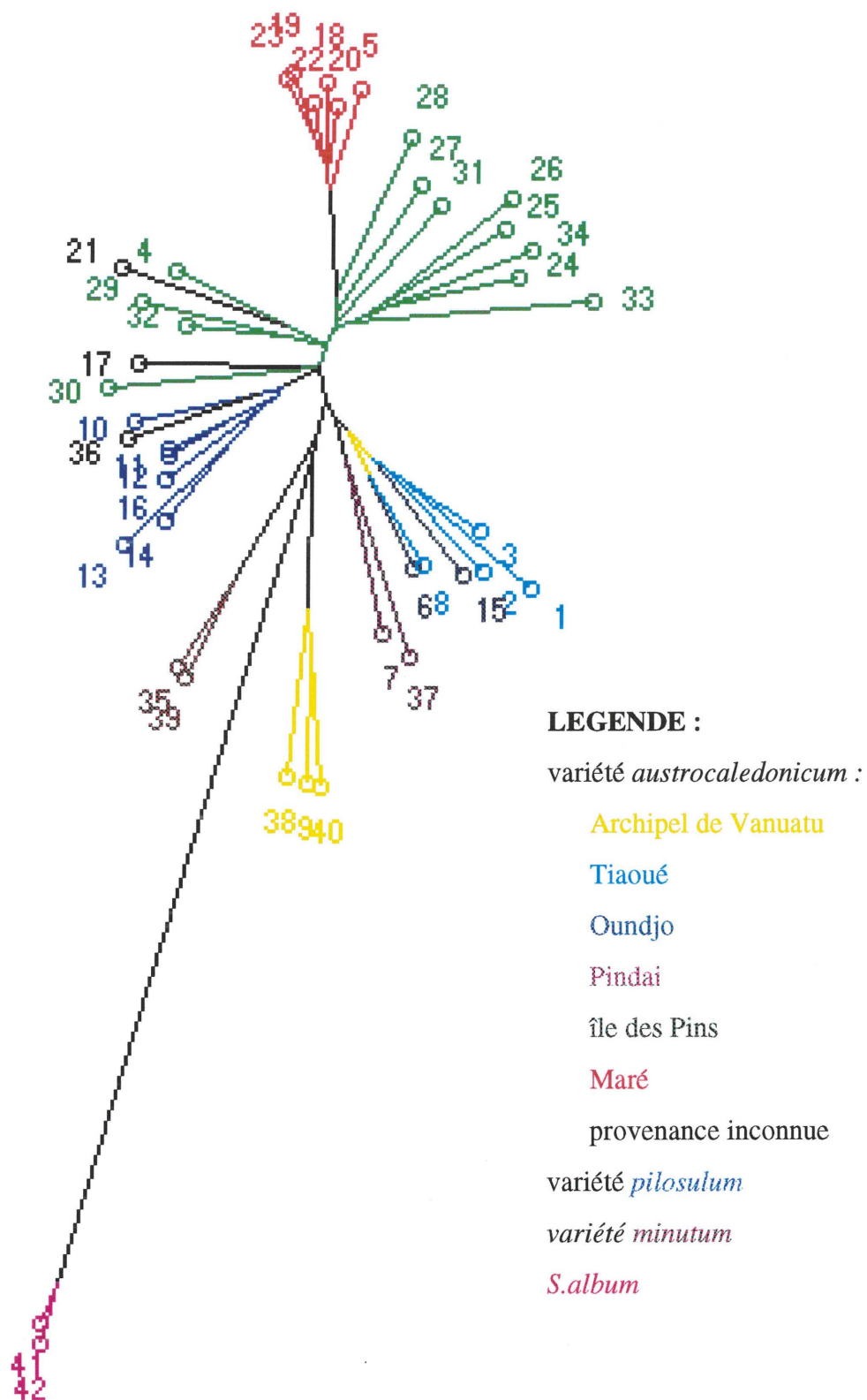
+ / - : marqueur présent / absent

b- Marqueurs communs à deux provenances

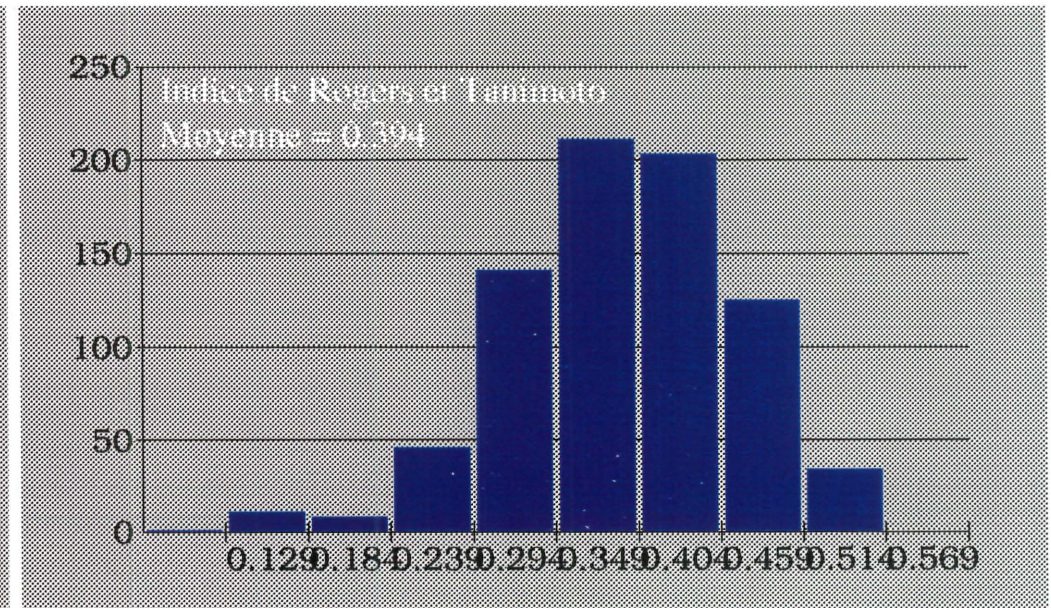
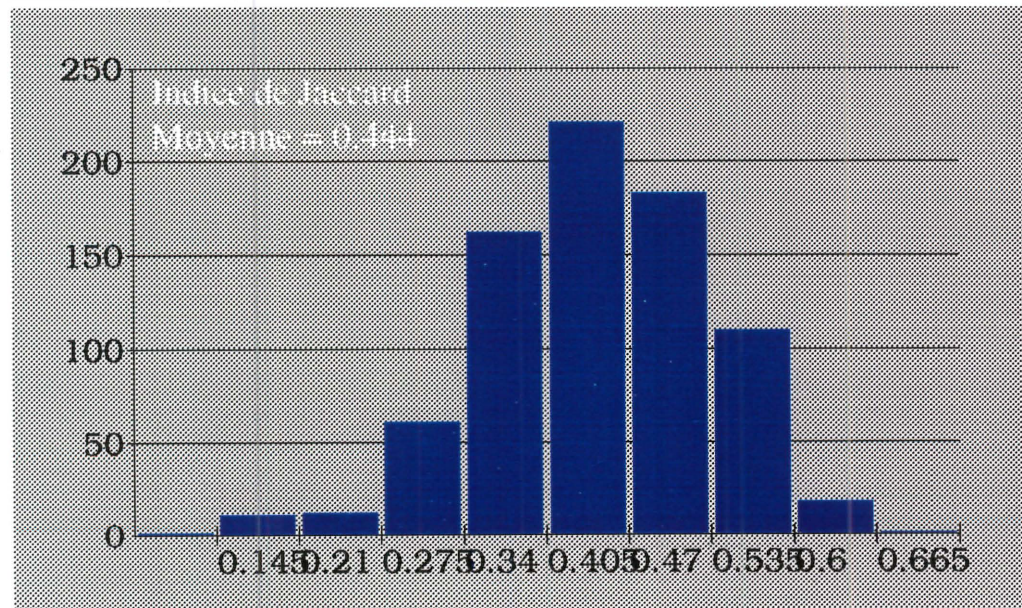
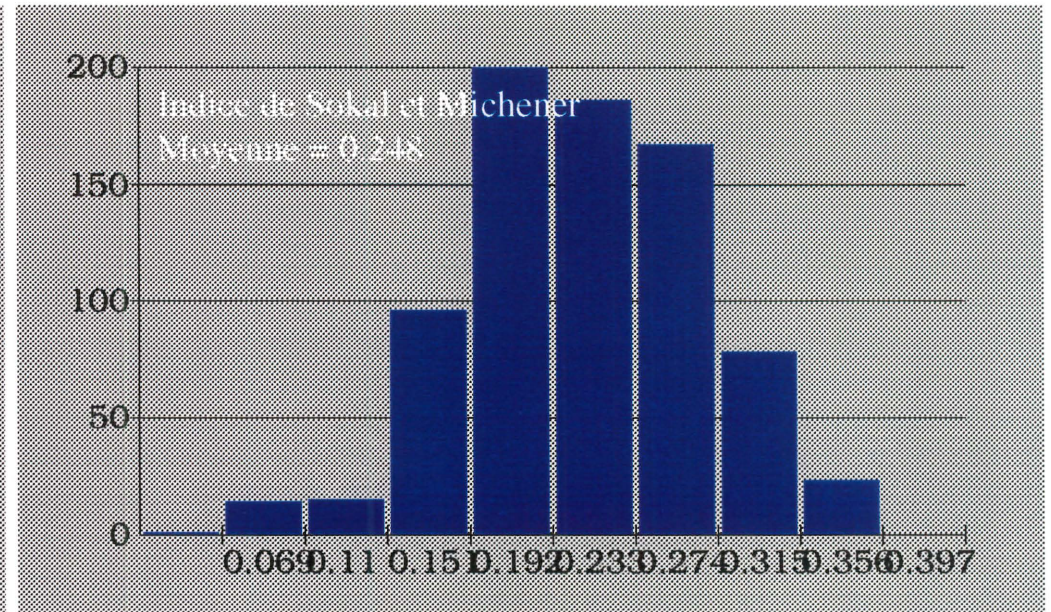
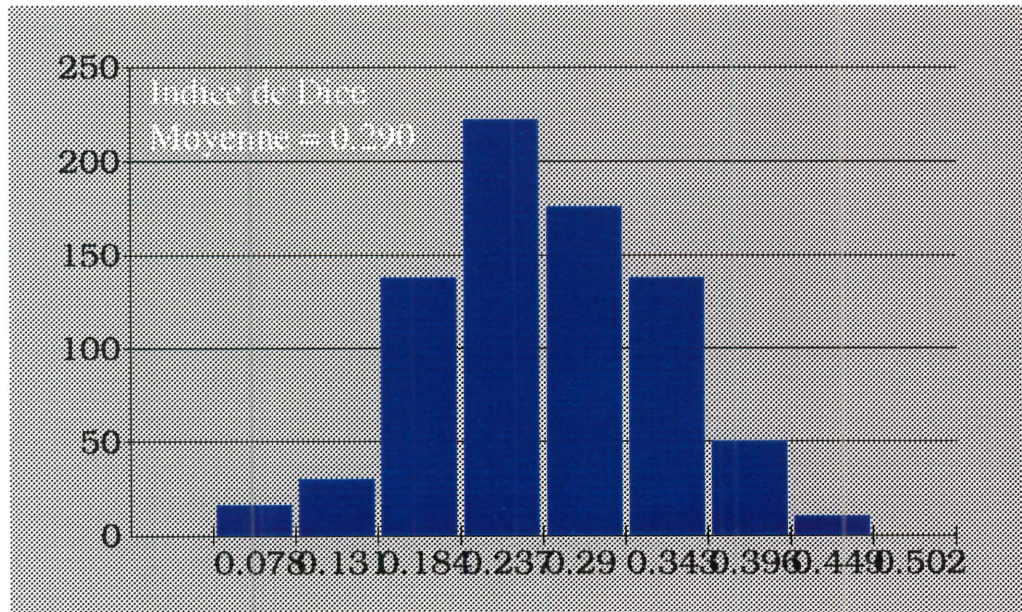
Provenances ou variétés	Marqueur RAPD	Nombre d'individus		
		avec le marqueur	sans le marqueur	total
Minutum / Album	X06_557 +	4 (35, 39, 42, 43)	0	4
	Y20_843 -	0	4 (35, 39, 42, 43)	4
Pindai / Vanuatu	X11_909 +	4 (7, 9, 38, 41)	1 (37)	5
Maré / Ile des Pins	Y06_298 +	11 (5, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 33)	8 (4, 21, 26, 29, 30, 31, 32, 34)	19
	W19_770 +	2 (5, 24)	17	19
Maré / Grande Terre	W02_344 -	0	21	21
	W07_612 +	11	10 (3, 6, 7, 8, 10, 16, 22, 23, 36, 37)	21
Grande Terre / Ile des Pins	W06_782 +	19	9 (4, 12, 24, 25, 28, 29, 32, 33, 34)	28

Individus de la Grande Terre : 1, 2, 3, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 36, 37.

**Annexe n°5 : Dendrogramme obtenu par la méthode des Scores
Indice de similarité de Dice**



**Annexe n°6 : Répartition de différentes distances génétiques (780 valeurs)
obtenues à partir de 40 origines de *Santalum austrocaledonicum***



a- Composition chimique d'huiles essentielles de santals du Pacifique Sud.

(Components)		Maré	IDP	Erromango	Tonga	Mysore
		Santalum austrocaledonicum		S.yasi	S.album	
Composés oxygénés volatils						
6	inconnu	0.25	0.14		0.02	
8	tricycloékasantalal ^(c)	0.05	0.07		0.06	
Hydrocarbures						
10	inconnu C ₁₅ H ₂₄	t	0.03			
11	inconnu C ₁₅ H ₂₄	0.01				
12	cis-α-bergamotène ^(c)	0.01				
13	α-santalène	1.26	0.74	0.21	0.55	1.14
14	trans-α-bergamotène	0.18	0.12	0.05	0.05	0.2
16	épi-β-santalène	0.99	0.6	0.3	0.81	1.27
17	trans-β-farnésène	0.02				
18	β-santalène	0.96	0.57	0.27	0.84	1.86
19	α-acoradiène ^(c)	0.03				
20	β-acoradiène ^(c)	0.05				
21	γ-curcumène	0.13	0.1	0.17	0.14	0.48
22	α-curcumène	0.21	0.18			
23	inconnu C ₁₅ H ₂₄	0.02		0.02		
25	(Z)-α-bisabolène	0.03		t		
26	β-bisabolène	0.31	0.2	0.03		
27	β-curcumène	0.29	0.14	0.08		
28	sesquicinéole	0.01				
30	inconnu C ₁₅ H ₂₂				3.14	
31	β-sesquiphelandrène ^(c)	0.02				
33a	trans-γ-bisabolène	0.01		0.03		
34	inconnu C ₁₅ H ₂₄	0.07			1.47	
Sesquiterpènes oxygénés						
35	hydrate de cis-sesquisabinène ^(c)				1.7	
37	(E)-nérolidol	0.02	0.18			
38a	dendrolasine	0.07	0.13			
38b	inconnu C ₁₅ H ₂₄ O	0.01		0.04		
41	inconnu C ₁₅ H ₂₆ O	t				
43	inconnu C ₁₅ H ₂₆ O	t				
45	inconnu C ₁₅ H ₂₄ O	0.08				
46	α-acorénol ^(c)	0.01				
47	β-acorénol ^(c)	0.02				
49	inconnu C ₁₅ H ₂₄ O	0.01				
52	β-bisabolol	0.8	0.4	0.31	0.4	
54	α-santalol	48.2	48.83	47.47	40.17	48.04
55	épi-α-bisabolol				0.97	2.43
56	(Z)-α-trans-bergamotol	6.9	7.44	10.38	7.64	4.08
57	épi-β-santalol	3.99	4.26	3.45	2.67	4.75
58	(Z,Z)-farnésol		1.57		0.3	
59	β-santalol	19.9	21.81	24.47	29.44	20.53
60	(Z)-nuciférol	0.37	0.24	4.49	0.5	t
61	trans-β-santalol	0.86	0.78	0.25	1.24	1.92
62	(E)-nuciférol ^(c)	1.3	1.33	0.97	1.58	1.98
63	(E)-lancéol	8.2	7.13	1.2	1.94	
64	acétate de cis-α-santalyle	0.4	0.18	0.28	0.4	
65	acétate de (Z)-α-trans-bergamotyle	0.36	0.04			
67	acétate de cis-β-santalyle	0.06	0.29			
68	acétate de cis-nuciféryle	0.02				
70	acétate de lancéyle ^(b)	0.03				
Fraction lourde						
72	inconnu (B)	t				
75	bisabola-2,10-diène-6,12-diol (E)	t	0.12			
76a	camphérène-10-én-4,12-diol (F) ^(a)	t	0.08			

Mysore données de la littérature, description incomplète uncomplete description, only the main components are quoted
Source: Thèse de doctorat, J.ALPHA

Characteristics		Experimental values				Quoted in literature	
		New-Caledonia	Vanuatu	Tonga		India	W-Australia
		S.austrocaledonicum		S.yasi		S.album	S.spicatum
French Norm		Ile des Pins	Maré	Erromango	Eua	Mysore	
Physical							
Specific gravity at 20 °C	NF T 75-111	0,969	0,973	0,962	0,972	0,968 - 0,983	0,968 - 0,978
Refraction index at 20 °C	NF T 75-112	1,506 5	1,507 2	1,507 5	1,506 1	1,503 0 - 1,508 0	1,504 0 - 1,510 0
Optical rotation	NF T 75-113	- 6° 5	- 17 ° 5	-13°	-3° 6	-21° << -15°	-8° << -3°
Ethanol 70° solubility	NF T 75-101	3 vol. for 1 of oil	3 vol. for 1 of oil	3 vol. for 1 of oil	3 vol. for 1 of oil	< 5 vol. for 1 of oil	< 5 vol. for 1 of oil
Chemical							
Acid index	NF T 75-103	2,1	2,0	0,9	1,9	?	< 5
Ester index	NF T 75-104	6,7	11,8	9,3	8,9	< 10	4,5 - 18
Primary and secondary free alcohol ratio expressed in santalol	NF T 75-106	91%	88%	93%	87%	> 90 %	?

Reference: ALPHA 1997

b- Caractéristiques physico-chimiques d'espèces de santals du Sud Ouest du Pacifique.

RESUME

Le santal, petit arbre répandu dans l'aire pacifique s'étendant de l'Inde à l'Amérique du sud, est réputé pour l'huile essentielle obtenue par distillation de son bois de coeur. Cette substance utilisée dans de nombreux produits (encens, onguents...) est abusivement exploitée depuis le XVIIIème siècle. De ce fait, certaines espèces sont en voie d'extinction tandis que d'autres, encore présentes dans l'aire de répartition, subissent une diminution de leur diversité génétique. Ces faits sont préoccupants et, afin de mettre en place des stratégies de protection et de propagation, cette étude tente d'estimer et de comprendre la variabilité génétique des santals de Nouvelle-Calédonie et de l'archipel de Vanuatu par l'utilisation de la technique RAPD. Les résultats montrent que l'espèce *Santalum austrocaledonicum* répandue sur ces terres est divisée en variétés bien différenciées d'un point de vue génétique, en accord avec la taxonomie actuelle (Hallé 1988). Par contre, on peut constater qu'au sein de la variété *austrocaledonicum*, les individus de Maré, de Vanuatu et de la Grande Terre Nord forment des groupes très individualisés à la diversité réduite, tandis que ceux de l'île des Pins présentent une variabilité génétique plus importante. La structuration génétique mise en évidence est très forte.

Ces connaissances seront importantes pour établir des plans de gestion adaptés aussi bien pour la conservation de la biodiversité que pour assurer la production durable d'huiles de qualité.

Mots clés : *Santalum austrocaledonicum*, marqueurs RAPD, distances génétiques, variabilité génétique.

SUMMARY

Sandal, common in the pacific area from India to South America, is famous for the essential oil obtained by distillation of its heartwood. This product, which is very used (incense, ointments...), is over exploited since the 18 th century. In this way, some species are endangered whereas others, always present in the area, suffer from the decrease of their genetic diversity. These facts are worrying and, in order to invent some protection and propagation strategies, this study try to estimate and understand genetic variability of sandals coming from New-Caledonia and Vanuatu by using RAPD technic. The data show that *Santalum austrocaledonicum* species from this area is divided into well geneticaly differentiated varieties, in harmony with the taxonomy (Hallé 1988). Moreover, we can see that in *austrocaledonicum* variety, trees from Maré, Vanuatu and North "Grande Terre" form well individualized groups with a low diversity, whereas ones from l'île des Pins grow in a big range of variability. The genetic structuration is very strong.

These knowledges will be important to establish management strategies adapted to the conservation of the biodiversity and to ensure high quality oil durable production.

Key words : *Santalum austrocaledonicum*, RAPD markers, genetic dissimilarities, genetic variability.